

**KARAKTERISASI NANOENKAPSULASI KITOSAN-EKSTRAK  
ETANOL 70% DAUN SIRIH (*Piper betle* Linn)  
DENGAN METODE GELASI IONIK**

**NASKAH PUBLIKASI**



**Oleh:**

**GIA SAPUTRA**

**I22111038**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS TANJUNGPURA  
PONTIANAK**

**2016**

**NASKAH PUBLIKASI**  
**KARAKTERISASI NANOENKAPSULASI KITOSAN-EKSTRAK**  
**ETANOL 70% DAUN SIRIH (*Piper betle* Linn)**  
**DENGAN METODE GELASI IONIK**

Oleh:  
**GIA SAPUTRA**  
**NIM: 122111038**

**Telah Dipertahankan Dihadapan Panitia Penguji Skripsi**  
**Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran**  
**Universitas Tanjungpura**  
**Tanggal : 05 Januari 2015**

Disetujui,

**Pembimbing Utama**

**Nera Umilia Purwanti, M. Sc., Apt**  
**NIP. 1981 0224 2008 122 003**

**Penguji Pertama**

**Rise Desnita M, Si., Apt**  
**NIP. 1981 1220 2009 122 003**

**Pembimbing Pendamping**

**Wintari Taurina, M.Sc., Apt**  
**NIP. 1983 0421 2008 012 007**

**Penguji Kedua**

**Pratiwi Apridamayanti M, Sc., Apt**  
**NIP. 1986 0418 2000 122 009**

Mengetahui,  
**Dekan Fakultas Kedokteran**  
**Universitas Tanjungpura**

**dr. Arif Wicaksono, M. Biomed**  
**NIP. 1983 1030 2008 121 002**

**Lulus tanggal : 05 Januari 2015**  
**No. SK Dekan FK Untan :**  
**Tanggal :**

**KARAKTERISASI NANOENKAPSULASI KITOSAN-EKSTRAK  
ETANOL 70% DAUN SIRIH (*Piper betle* Linn)  
DENGAN METODE GELASI IONIK**

**Gia Saputra<sup>1</sup>, Nera Umilia Purwanti<sup>2</sup>, Wintari Taurina<sup>3</sup>**

<sup>123</sup> Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak  
gia.putra25@gmail.com

**ABSTRAK**

Daun sirih merupakan salah satu tanaman obat yang memiliki khasiat sebagai antioksidan. Kandungan kimia yang diduga memiliki aktivitas antioksidan yaitu polifenol. Namun, senyawa ini memiliki kelemahan yaitu tidak stabil terhadap pengaruh suhu dan intensitas cahaya tinggi sehingga mudah teroksidasi. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan dan melindungi senyawa tersebut dari kerusakan adalah dengan nanoenkapsulasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik nanoenkapsulasi yang mengandung ekstrak etanol daun sirih dengan berbagai variasi kitosan meliputi ukuran partikel, zeta potensial, morfologi partikel dan inhibisi ekstrak yang tidak terjerap, sehingga diperoleh formula dengan karakteristik yang paling optimal. Penelitian ini digunakan kitosan sebagai polimer serta natrium tripolifosfat sebagai agen penaut silang untuk membentuk nanopartikel melalui metode gelasi ionik. Nanopartikel dibuat dalam empat formula dengan memvariasikan konsentrasi larutan kitosan antara lain 0,1%, 0,2%, 0,3%, dan 0,4% b/v yaitu F1, F2, F3 dan F4. Berdasarkan hasil karakterisasi nanopartikel ekstrak etanol daun sirih konsentrasi kitosan 0,3% merupakan konsentrasi yang paling optimal dalam formulasi sediaan nanopartikel dengan ukuran partikel sebesar 257,8 nm, indeks polidispersitas 0,236, nilai zeta potensial +30,7 mV, nilai persen inhibisi ekstrak yang tidak terjerap sebesar 16,434%±0,687 dan bentuk morfologi partikel yang tidak sferis.

**Kata Kunci:** Daun Sirih, Kitosan, Natrium Tripoliposfat, Nanopartikel, Karakterisasi

# **CHARACTERIZATION OF NANOENCAPSULATION CHITOSAN-ETHANOL 70% EXTRACT BETEL LEAF CHITOSAN (*Piperbetle* Linn) WITH IONIC GELATION METHOD**

**Gia Saputra<sup>1</sup>, Nera Umilia Purwanti<sup>2</sup>, Wintari Taurina<sup>3</sup>**  
<sup>123</sup> Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tanjungpura, Pontianak  
**gia.putra25@gmail.com**

## **ABSTRACT**

Betel leaf was a medicinal plant that have antioxidant properties. Chemical constituents be expected to has antioxidant activity is polyphenols. However, these compounds has disadvantage of unstable to temperature effect and high light intensity so it was easily oxidized. One effort that can be done to preserve and protect the compound from damage is by nanoencapsulation. The purpose of this research was to know about characteristics of nanoencapsulation that contain ethanol extracts of betel leaf with a variety of chitosan include particle size, zeta potential, particle morphology and extract inhibition which doesn't trap thus obtained a formula with the most optimal characteristics. This research used chitosan as polymer and sodium tripolyphosphate as cross linker agent for forming nanoparticles through ionic gelation method. Nanoparticles made in four formulas with varying concentrations of chitosan solution, among others, 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4% b/v, to F1, F2, F3 and F4. Based on the results of nanoparticle characterization of ethanol extract betel leaf, concentration chitosan 0.3% was the optimal concentration in the formulation of nanoparticles with a particle size of 257,8 nm, polydispersity index 0,236, zeta potential value +30.7 mV, extract inhibition which doesn't trap values of 16,434%±0,687 and particle morphology form not spheric.

**Keywords: Betel leaf, Chitosan, Sodium Tripolyphosphate, Nanoparticles, Characterization**

## PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan sumber bahan alam yang telah sejak lama digunakan oleh masyarakat sebagai pengobatan. Berbagai penelitian dan pengembangan yang memanfaatkan kemajuan teknologi serta dilakukan berbagai upaya dalam peningkatan mutu dan kepercayaan terhadap manfaat sumber bahan alam<sup>1</sup>. Salah satu tanamannya adalah sirih.

Daun sirih (*Piper betle* Linn) banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat sariawan, obat keputihan, mimisan, mempercepat penyembuhan luka, menghilangkan bau mulut dan mengobati sakit gigi<sup>2</sup>. Beberapa penelitian yang pernah dilakukan terhadap daun sirih (*Piper betle* L.) menunjukkan bahwa daun sirih memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, analgetik, antibakteri dan antioksidan<sup>3,4</sup>.

Daun sirih memiliki kandungan utama berupa senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid/steroid, dan fenolik. Namun, senyawa yang berperan dalam memberikan aktivitas farmakologi memiliki kelemahan yaitu tidak stabil terhadap pengaruh suhu dan intensitas cahaya tinggi sehingga mudah teroksidasi, seperti senyawa flavanoid dan polifenol<sup>5</sup>. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan dan melindungi senyawa tersebut dari kerusakan adalah dengan nanoenkapsulasi.

Nanoenkapsulasi adalah penyalutan suatu bahan atau materi dalam ukuran nano 1-1000 nm<sup>6</sup>. penggunaan polimer kitosan yang dapat melindungi zat aktif oleh pengaruh suhu tinggi dan faktor

lingkungan akibat adanya sifat tahan panas yang dimiliki kitosan, sehingga dapat meningkatkan stabilitasnya<sup>7</sup>.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi optimal dari kitosan yang dapat membentuk nanopartikel ekstrak etanol daun sirih dan karakteristiknya meliputi ukuran partikel, zeta potensial, dan morfologi partikel. Serta inhibisi nanopartikel terhadap DPPH.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex<sup>®</sup>), timbangan digital (Precisa Tipe XB 4200C<sup>®</sup>), *rotary evaporator* (Heidolph Tipe Heizbad Hal-VAP<sup>®</sup>), oven listrik (Modena<sup>®</sup>), *magnetic stirrer*, sentrifugator (PLC Series<sup>®</sup>), *Particle Size Analyzer* (Beckman Coulter<sup>®</sup>), Zeta Potensial (Horiba Scientific SZ-100<sup>®</sup>), *Scanning Electron Microscopy* (Hitachi TM 3000) dan spektrofotometri UV-Vis (Reyleigh<sup>®</sup>).

### Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirih, etanol 70% (PIM Pharmaceutical, No. Batch 46311301), metanol (Merck<sup>®</sup>, No.Batch 1.06009.2500), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Merck<sup>®</sup>), kitosan (Biotech Surindo No.Batch 10A0215.F.M.CHC) dan Na-TPP.

### Determinasi Tanaman

Tanaman sirih (*Piper betle* L.) yang digunakan dideterminasi di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tanjungpura Pontianak.

### Ekstraksi Simplisia Daun Sirih

Simplisia daun sirih 200 gram dicampurkan dengan sejumlah pelarut etanol 70% sampai terendam dan di biarkan selama 24 jam. Filtrat yang didapat kemudian ditampung dan sisa penyaringan direndam kembali dengan pelarut yang baru<sup>8</sup>. Ekstrak etanol daun sirih dipekatkan menggunakan alat evaporator dengan suhu 50°C dan waterbath dengan suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental.

### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terdiri dari uji alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan triterpenoid, fenol, dan tanin.

### Penetapan Susut Pengeringan

Cawan krusibel kosong ditimbang beserta tutupnya lalu dipanaskan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit, selanjutnya didinginkan ke dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang hingga didapatkan bobot konstan.

Ditimbang secara seksama sebanyak ± 1 gram dan di masukkan ke dalam krusibel yang telah dikonstankan. Cawan krusibel yang berisi ekstrak dipanaskan kembali pada suhu 105°C selama 1 jam. Setelah dipanaskan, didinginkan kedalam desikator selama 15 menit lalu ditimbang. Pengeringan dilanjutkan pada suhu 105°C sampai diperoleh bobot konstan yaitu perbedaan penimbangan dua kali berturut-turut tidak lebih dari 0,5 mg untuk tiap gram zat yang digunakan<sup>9</sup>. Susut pengeringan ekstrak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{a - b}{a} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = Berat awal ekstrak

B = Berat akhir ekstrak

### Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak ± 1 gram ekstrak (W<sub>0</sub>) dimaserasi dengan 20 mL etanol 96% selama 24 jam menggunakan botol atau wadah sambil sesekali dikocok. Hasil maserasi lalu disaring dan filtrat dimasukan kedalam krusibel kemudian dipanaskan menggunakan oven pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot konstan (W<sub>1</sub>)<sup>8</sup>. Kadar sari larut etanol dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{W_1}{W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W<sub>0</sub> = bobot ekstrak awal

W<sub>1</sub>= bobot konstan cawan + sampel yang telah dikeringkan

### Pembuatan Nanoenkapsulasi Kitosan-Ekstrak Etanol Daun Sirih

**Tabel 1. Formula Nanoenkapsulasi**

Bahan	P1	P2	P3	P4
Ekstrak etanol daun sirih (mg/mL)	8	8	8	8
Kadar kitosan (% b/v ) dalam 6 mL larutan asam asetat 1%	0,1	0,2	0,3	0,4
Kadar Na-TPP (% b/v) dalam 1 mL larutan air	0,1	0,1	0,1	0,1

Kitosan dibuat dengan konsentrasi 0,1% - 0,4 % b/v yang dilarutkan kedalam asam asetat 1% b/v. Dibuat Larutan Na-TPP 0,1%. Dibuat larutan stok, dengan menimbang 80 mg ekstrak daun sirih dilarutkan dalam 10 mL etanol 70%. Sebanyak 1 mL larutan stok ekstrak

ditambahkan kedalam larutan Na-TPP 0,1% dengan cara diteteskan disertai pengadukan menggunakan magnetik stirrer. Kemudian campuran ekstrak dan tripolifosfat ditambahkan ke dalam larutan kitosan (variasi konsentrasi 0,1–0,4% b/v) setetes demi setetes pada temperatur ruangan di bawah putaran magnetik stirrer dengan kecepatan 1500 rpm selama 3 jam hingga terbentuk suspensi nanopartikel. Formula nanoenkapsulasi kitosan-ekstrak etanol daun sirih terdapat pada (Tabel 1).

#### Karakterisasi Nanopartikel

Karakterisasi Nanopartikel yang dilakukan meliputi ukuran partikel, potensial zeta dan morfologi nanopartikel. Serta inhibisi ekstrak yang tidak terjerap.

#### Inhibisi Ekstrak yang Tidak Terjerap

Pengukuran inhibisi ekstrak etanol daun sirih pada metode DPPH yang digunakan oleh molyneux, 2003 dengan sedikit modifikasi. Dibuat larutan DPPH 40 ppm dalam pelarut metanol menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang dibaca serapannya pada panjang gelombang 515,5 nm.

Sebanyak 1 mL larutan stok ekstrak daun sirih di *freeze dry* kemudian dilarutkan dalam 1 mL metanol dan di campurkan dalam 2 mL DPPH 40 ppm. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi selama 30 menit. Diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Suspensi nanopartikel kitosan ekstrak etanol daun sirih disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm, selama 15 menit. Selanjutnya filtrat diambil lalu di *freeze dry*.

Kemudian dilarutkan dengan menggunakan 1 mL metanol dan ditambahkan dengan 2 mL DPPH 40 ppm lalu dihomogenkan. Lalu diinkubasi selama 30 menit dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Inhibisi nanopartikel terhadap DPPH dapat dihitung dengan persamaan :

$$\text{Inhibisi Ekstrak yang Tidak Terjerap Nanopartikel} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \%$$

Keterangan:  $A_0$  = Absorbansi DPPH

$A_1$  = Absorbansi ekstrak yang tidak terjerap

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi tumbuhan yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tanjungpura terhadap tumbuhan menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah benar tanaman sirih (*Piper betle* L.).

Tahapan awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah mengeskraksi daun sirih dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi dipilih sebagai metode ekstraksi karena maserasi digunakan untuk mengekstrak senyawa yang tidak tahan panas. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% dengan hasil rendemen ekstrak dari proses maserasi sebesar 22,37% b/b.

#### Hasil Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak Daun Sirih

Skrining fitokimia digunakan untuk mendeteksi kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman secara kualitatif yang memiliki aktivitas biologis. Pendeteksian senyawa kimia pada ekstrak dilakukan dengan metode pereaksi warna menggunakan uji tabung.

Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia**

Senyawa Metabolit Sekunder	Hasil
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Steroid/terpenoid	+
Fenolik	+
Tannin	+

Keterangan: (+) mengandung senyawa yang diuji  
(-) tidak mengandung senyawa yang diuji

Penetapan susut pengeringan digunakan untuk mengetahui kadar air dan pelarut yang masih tersisa didalam ekstrak sehingga dapat diketahui golongan ekstrak. Berdasarkan uji yang telah dilakukan diperoleh persen susut pengeringan sebesar  $24,739\% \pm 1,07$ . Hasil persentase ini menunjukkan bahwa ekstrak tergolong kedalam ekstrak kental dikarenakan persentase kandungan air dan pelarut dalam ekstrak mencapai 5%-30%<sup>10</sup>.

Hasil kadar sari larut etanol yang diperoleh sebesar  $62,31\% \pm 1,44$ . Hasil ini menunjukan bahwa sebanyak  $62,31\% \pm 1,44$  senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih dapat larut dalam etanol.

#### Hasil Formulasi Nanopartikel

Pembuatan nanoenkapsulasi kitosan–ekstrak daun sirih dilakukan dengan metode gelasi ionik, yakni dengan menambahkan Na-TPP sebagai bahan penaut silang dengan kitosan. Formulasi nanopartikel ekstrak dilakukan dengan perbandingan kitosan, Na-TPP dan ekstrak berturut turut adalah 6:1:1. Ekstrak yang digunakan sebanyak 8 mg/ml<sup>11</sup>.

Selanjutnya dilakukan optimasi terhadap waktu pengadukan dalam proses formulasi sediaan nanopartikel. Optimasi dilakukan dengan membandingkan waktu pengadukan selama 2 jam, 2,5 jam dan 3 jam terhadap nanopartikel yang dihasilkan dengan melihat ada tidaknya, partikel melayang dan endapan yang terbentuk selama 7 hari. Hasil menunjukkan bahwa pengadukan yang dilakukan selam 3 jam merupakan waktu yang paling optimal.

#### Hasil Uji Karakterisasi Nanopartikel

Hasil uji karakterisasi nanopartikel dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil Karakterisasi Nanopartikel**

Formula	Ukuran Partikel	Indek Polidispers	Zeta Potensial	Inhibisi Ekstrak yang Tidak Terjerap Nanopartikel
1	165,7 nm	0,181	+26,3 mV	19,531%
2	192,3 nm	0,240	+32,3 mV	18,328%
3	257,8 nm	0,236	+30,7 mV	16,434%
4	320,8 nm	0,198	-	-

#### Ukuran dan Distribusi Ukuran Partikel

Ukuran partikel adalah diameter rata-rata suatu partikel. Hasil yang diperoleh, menunjukkan ukuran partikel yang berbeda-beda. Ukuran partikel berturut-berturut pada F1, F2, F3 dan F4 yaitu 165,7 nm, 192,3 nm, 257,8 nm, dan 320,8 nm. Ukuran partikel yang baik dalam sistem penghantaran obat untuk sediaan oral adalah kurang dari 300nm<sup>12</sup>. Sehingga ukuran partikel F1, F2 dan F3 memiliki ukuran nanopartikel yang baik dalam sistem penghantaran obat, dikarenakan hasil yang diperoleh memiliki ukuran partikel < 300 nm.



Distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indeks polidispersitas (IP). IP adalah nilai yang menyatakan lebarnya distribusi ukuran partikel di dalam suatu sediaan. Rentang IP berada diantara 0 sampai dengan 1. Nilai indeks polidispersitas kurang dari 0,5 bersifat monodispersi sedangkan indeks polidispersitas dengan nilai lebih dari 0,5 bersifat polidispersi<sup>13</sup>. Nilai IP yang dihasilkan dari keempat formula menunjukan bahwa distribusi ukuran partikel yang dihasilkan bersifat monodispers, artinya distribusi partikel dari keempat formula memiliki ukuran partikel yang seragam dimana nilai IP yang dihasilkan berada pada rentang 0,1-0,3.

#### **Zeta Potensial**

Nilai zeta potensial secara umum digunakan untuk mengetahui sifat muatan partikel dan kestabilan nanopartikel. Suatu partikel dinyatakan stabil bila memiliki nilai potensial zeta diluar rentang  $\pm 30$  mV<sup>13</sup>. Nilai zeta potensial formula 1,2,3 berturut-turut sebesar +26,3 mV, +32,3 mV, dan +30,7 mV. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan 0,2% dan 0,3% menunjukkan nilai yang lebih stabil dibandingkan dengan konsentrasi kitosan 0,1%, dikarenakan nilai zeta potensial yang dihasilkan melebihi +30mV.

#### **Morfologi Nanopartikel**

Pengamatan morfologi sediaan nanopartikel yang terbentuk dilakukan dengan menggunakan (*Scanning Electron Microscopy*) (SEM). Hasil karakterisasi diperoleh F3 sebagai formula optimum dilihat dari hasil karakterisasi dan Inhibisi ekstrak yang tidak terjerap. Sehingga

pengamatan morfologi nanopartikel dilakukan pada F3. Hasil pengujian SEM menunjukkan bentuk morfologi nanopartikel ekstrak daun sirih tidak sferis, yang ditunjukkan pada gambar 1. Semakin tidak sferis suatu partikel maka semakin banyak sudut pada partikel, yang dapat menyebabkan terbentuknya aglomerasi.

#### **Inhibisi Ekstrak yang Tidak Terjerap**

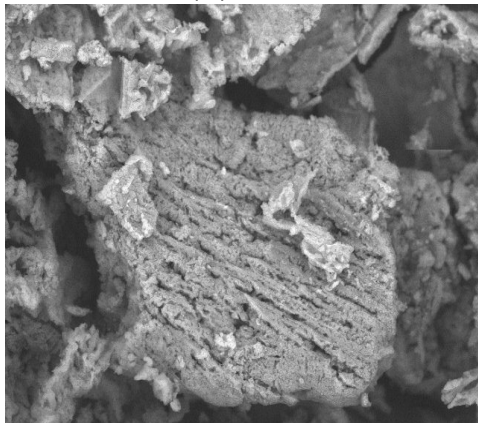
Inhibisi ekstrak yang tidak terjerap merupakan persentase yang menggambarkan seberapa banyak ekstrak yang tidak terjerap atau terenkapsulasi didalam sediaan nanopartikel yang dihasilkan. Inhibisi ekstrak yang tidak terjerap dilakukan menggunakan metode DPPH, dengan cara membandingkan antara absorbansi DPPH dan absorbansi ekstrak tidak terjerap.

Baku pembanding yang digunakan adalah DPPH. Kemudian DPPH dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum 515,5 nm. Hasil pengukuran diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan regresi  $y = 0,0210x - 0,0555$  dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9998. Hasil penelitian diperoleh persentase inhibisi ekstrak yang tidak terjerap berturut-turut yaitu 19.531%  $\pm 0.22$  (F1), 18.328%  $\pm 0.715$  (F2) dan 16.434%  $\pm 0.687$  (F3). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa setiap formula memiliki persen inhibisi yang kecil pada ekstrak yang tidak terjerap. Semakin kecil nilai persen inhibisi maka semakin besar kemampuan polimer kitosan dapat meng-enkapsulasi dan melindungi zat aktif, sehingga semakin besar zat aktif yang dapat terenkapsulasi.

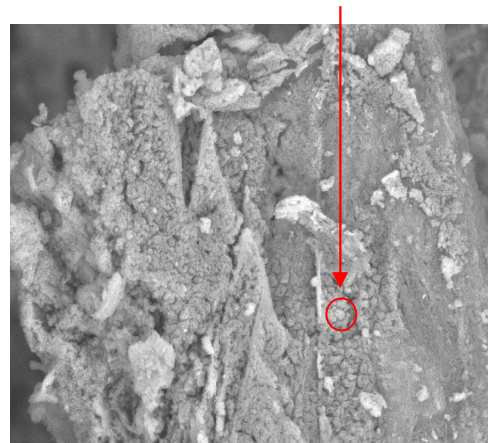
## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan konsentrasi kitosan 0,3% (formula 3) merupakan konsentrasi yang paling optimal dalam pembuatan sediaan nanopartikel ekstrak etanol daun

(A)



sirih, dengan hasil karakterisasi ukuran partikel sebesar 257,8 nm, indeks polidispersitas sebesar 0,236, nilai zeta potensial sebesar +30,7 mV, dan bentuk morfologi partikel yang tidak sferis. Serta nilai persen inhibisi ekstrak yang tidak terjerap yaitu  $16.434\% \pm 0.687$ .



**Gambar 1. Hasil Morfologi Partikel yang diamati dengan SEM  
(A) Perbesaran 1000x dan (B) Perbesaran 1800x**

## DAFTAR PUSTAKA

1. Wijayakusuma HM.. Tanaman berkhasiat obat di Indonesia. Jakarta: Pustaka Kartini. 1992.
2. Moeljanto RD dan Mulyono. Khasiat dan Manfaat Daun Sirih, Obat Mujarab dari Masa ke Masa. Jakarta: Penebar Swadaya. 2003. 9-15 p.
3. Serlahwaty Diana, Sugiasuti Setyorini, Chandra RN. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Etanol 70% Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Sirih Merah (*Piper cf. Fragile* Benth. ) dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2011; 143-6.
4. Badrul Alam, Fahima Akter, Nahida Parvin, Rashna Sharmin Pia, Sharmin Akter, et al. Antioxidant, Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Extract of Piper betle Leaves. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2013; 3 (2): 112-5.
5. Anlysn Eric, Dougherty, Dennis. Modern Physical Organic chemistry. California: University Science Books Sausalito. 2006. 47-53 p.
6. Mohanraj Vj, Chen Y. Nanoparticles A review. Trop J Of Pharmaceut Res. 2006; 561-573.
7. Carvajal MXQ, Diaz BHC, Tores LSM, Perez JJC, Beltran LA, Aparicio AJ. Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing. Food Eng Rev. 2010; 2 (1): 39-50.

8. Departemen Kesehatan RI. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta : Departemen Kesehatan RI. 2000. 5; 9-12 p.
9. Departemen Kesehatan RI. Farmakope Indonesia edisi keempat. Jakarta : Departemen Kesehatan RI. 1995.
10. Voight R. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, Penerjemah Soendari, N.S., Yogyakarta: Gajahmada University Press. 1994. 561, 564, 577, 581 p.
11. Stoica R, Somoghi R, Ion RM. Preparation of Chitosan–Tripolyphosphate Nanoparticles for The Encapsulation of Polyphenols Extracted From Rose Hips. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. September 2013;8(3) 955-63.
12. Gupta RB, Ober CA. Nanoparticle Technology for Drug Delivery. New York: Taylor and Francis Group. June 2011; 6 (72): 714-26.
13. Avadi MR, Assal MMS, Nasser M, Saideh A, Fatemeh A, Rassoul D, & Morteza R. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2010; 6: 58–63.